

丁苯酞对大鼠心肌缺血再灌注损伤的预防作用及机制研究

周 菲*,张敬文,王 卫(海南省人民医院心血管内科,海口 570311)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3518-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.17

摘 要 目的:研究丁苯酞对大鼠心肌缺血再灌注损伤的预防作用及机制。方法:将SD大鼠随机分为假手术组、模型组和丁苯酞低、中、高剂量组(50、75、100 mg/kg),每组10只,各组大鼠每天ig相应药物1次,假手术组及模型组大鼠ig等量生理盐水,连续3 d。末次给药后除假手术组外其余各组大鼠再灌注120 min后检测各组大鼠心肌梗死面积比例、细胞凋亡率、凋亡相关蛋白[促凋亡蛋白(Caspase-3、Fas、Caspase-9)、抑制凋亡蛋白(Bcl-2)]表达、左室射血分数(LVEF)和血清中血管内皮生长因子(VEGF)含量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠的心肌梗死面积、心肌细胞凋亡率均明显升高,心肌细胞中Caspase-3、Fas、Caspase-9蛋白表达明显增强,Bcl-2蛋白表达明显减弱,LVEF和血清VEGF含量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,除丁苯酞低剂量组大鼠的LVEF无明显变化($P>0.05$)外,其余各给药组大鼠的上述指标均明显改善($P<0.05$)。与丁苯酞低剂量组比较,丁苯酞高剂量组大鼠的心肌梗死面积、细胞凋亡率均明显降低($P<0.05$);丁苯酞中、高剂量组大鼠心肌细胞中Caspase-3、Fas、Caspase-9蛋白表达明显减弱,Bcl-2蛋白表达明显增强($P<0.05$)。结论:丁苯酞可有效减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,保护心功能,其机制可能与上调VEGF有关。
关键词 丁苯酞;心肌缺血再灌注损伤;细胞凋亡;大鼠

Study on the Preventive Effect and Mechanism of Butylphthalide on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats

ZHOU Fei, ZHANG Jingwen, WANG Wei (Dept. of Cardiovascular Medicine, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the preventive effect and mechanism of butylphthalide on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. METHODS: SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, butylphthalide low-dose, medium-dose, high-dose groups (50, 75, 100 mg/kg), 10 in each group. All rats were intragastrically administrated related drugs once a day, sham operation group and model group were intragastrically administrated equal amount of normal saline, for 3 d. After last administration, except for sham operation group, 120 min of reperfusion was conducted. Ratio of myocardial infarction area, apoptosis rate of myocardial cells, expressions of apoptosis-related protein [proapoptotic proteins (Caspase-3, Fas, Caspase-9), apoptotic protein (Bcl-2)], left ventricular ejection fraction (LVEF), and content of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of rats in other groups were detected. RESULTS: Compared with sham operation group, myocardial infarction area and apoptosis rate of myocardial cells in model group were obviously increased; expressions of Caspase-3, Fas, Caspase-9 protein in myocardial cells were obviously enhanced, Bcl-2 protein expression was obviously weakened; LVEF and serum VEGF content were obviously reduced ($P<0.01$). Compared with model group, except that LVEF in butylphthalide low-dose group didn't changed obviously ($P>0.05$), above indexes in other administration groups improved obviously ($P<0.05$). Compared with butylphthalide low-dose group, myocardial infarction area and apoptosis rate of myocardial cells in butylphthalide high-dose group were obviously decreased ($P<0.05$); expressions of Caspase-3, Fas, Caspase-9 protein in myocardial cells in butylphthalide medium-dose, high-dose groups were obviously weakened, and Bcl-2 protein expression was obviously enhanced ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Butylphthalide can effectively reduce myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, protect cardiac functions, and its mechanism may be related with up-regulating VEGF.

KEYWORDS Butylphthalide; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Cell apoptosis; Rats

心血管疾病是中老年人群的常见病,每年因患该疾病致死人群数量在逐渐上升,其中包括心肌梗死在内的缺血性心脏病是主要的死因^[1]。一系列的研究结果表明,造成心肌组织损伤的主要原因,除了缺血所致损伤之外,在恢复血液再灌注后会对缺血心肌造成更严重的伤害,该现象称为缺血再灌注损伤(Ischemia-reperfusion, I/R),通过抑制心肌细胞凋亡保护I/R带来的心肌损伤已

成为当前研究的热点^[2]。丁苯酞临床上用于治疗脑I/R,其作用广泛,且口服同样有效,近年来发现丁苯酞也有保护心肌细胞的效果^[3]。本研究用丁苯酞预处理大鼠,考察丁苯酞对大鼠心肌I/R的预防作用及机制。

1 材料

1.1 仪器

Cobas8000全自动生化分析仪(美国罗氏制药有限公司);MK3酶标仪(美国Thermo公司);H-7650透射电子显微镜(日本Hitachi公司);Z323K低温高速离心机

* 主治医师,硕士。研究方向:冠心病介入治疗。E-mail: 13379950245@163.com

(德国 Hermle 公司);RM-6240B/C 多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)。

1.2 药品与试剂

丁苯酞对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:20160329,纯度:≥98%);原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒(美国 Roche 公司);兔抗人细胞凋亡抑制因子(Fas)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 9(Caspase-9)、Caspase-3 Western blot 试剂盒和辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(上海拜力生物科技有限公司);牛血清蛋白(德国 Merck Millipore 公司);血管内皮生长因子(VEGF)试剂盒(上海信帆生物科技有限公司)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,8 周龄,♂,体质量 290~320 g,由郑州大学实验动物中心提供,动物合格证号为:SCXK(豫)2016-0005。本实验过程中对大鼠的处理已通过本院动物伦理委员会同意。

2 方法

2.1 心肌 I/R 模型的建立

按照文献[4]方法建立心肌 I/R 模型。大鼠术前禁食不禁水 12 h 后,以 3% 戊巴比妥钠(70 mg/kg)ip 麻醉 3~5 min 后仰卧位固定于手术台,气管插管,连接呼吸机。胸骨正中切口,钝性分离皮下组织及肌肉,于胸骨左缘 3~4 肋间开胸,打开心包膜,分离脂肪,于左心耳下缘 1 mm 处以 7 号针线在冠状动脉左前降支(LAD)下方穿缝合线,将充水(0.5 mL)的球囊置于血管与结扎线间。结扎造成心肌缺血,心电图监测显示 ST 段抬高 0.2 mV 为心肌缺血建模成功。持续 30 min 后打开结扎线,抽出球囊,关胸再灌注 120 min。

2.2 分组与给药

参照文献[3]选择丁苯酞的给药剂量。将大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组、模型组和丁苯酞低、中、高剂量组(50、75、100 mg/kg),每组 10 只。将丁苯酞对照品溶于 0.5% 聚山梨酯 80 溶液中,质量浓度为 8 mg/mL,各组大鼠 ig 相应剂量的药物,假手术组和模型组大鼠 ig 等量生理盐水,每天 1 次,连续 3 d。然后除假手术组外,其余各组大鼠按“2.1”项下方法建立心肌 I/R 模型。

2.3 心肌梗死面积的测定

按照文献[5]方法测定。各组大鼠再灌注后用 3.6% 水合氯醛以 0.15 mL/10 g 麻醉后用肝素抗凝,取出心脏后用心脏灌流液经冠状动脉灌流冲洗,结扎 LAD,用 1% Evans Blue 生物染色剂灌注。灌注结束后分离心房和心室组织,将心室放入特制容器内,加冷却至 4 ℃ 的琼脂糖固定心脏。垂直心室长轴横切切片,每片 1~2 mm,将切片放入培养皿中,加入含 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4),37 ℃ 关闭孵育 30 min,置于 10% 甲醛溶液中过夜,封片。切片

中蓝色为非缺血区心肌,红色和灰红相间为缺血区心肌(AAR),灰白色为梗死心肌(IS)。用扫描仪成像,Image Pro Plus 6.0 图片分析软件计算各部分面积和梗死面积比例,梗死面积比例=梗死面积/缺血面积×100%。

2.4 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡率

将各组大鼠心脏放入 PBS 中,剪下缺血区心肌,洗净,用 4% 多聚甲醛于 4 ℃ 固定 24 h。将固定好的心肌组织用乙醇和二甲苯脱水及透明后,石蜡包埋,切片,按 TUNEL 试剂盒说明书操作进行染色。在光学显微镜下观察凋亡细胞的细胞核呈棕黄色。根据凋亡细胞分布,每张切片拍摄 5 张图片,每个标本切片随机选取 5 个 400 倍视野,计算平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数,计算细胞凋亡率,细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.5 Western blot 法测定凋亡相关蛋白表达

取各组大鼠缺血区心肌组织 10 mg,按每 10 mg 组织加入 200 μL 的 RIPA 裂解液及 PMSF 蛋白抑制剂,研磨后将心肌细胞匀浆转移至预冷的 1.5 mL 的 EP 管中,置于冰上 15 min 充分裂解,离心后弃上清液,-20 ℃ 保存。用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭,加入稀释 1 000 倍的一抗液,封口,4 ℃ 孵育过夜,用 PBS 洗膜 3 次;再加入稀释 5 000 倍的 HRP 标记的二抗,封口,PBS 洗膜 3 次;将膜浸泡于增强化学发光试剂中 5 min,除去多余液体后压片,在暗盒中于 X-光底片上曝光 5 min 后显影,检测灰度值。以目标蛋白与内参 β 肌动蛋白(β-actin)灰度值的比值表示 Caspase-3(促凋亡蛋白)、Fas(外在途径促凋亡蛋白)、Caspase-9(促凋亡蛋白)和 Bcl-2(内在途径抑制凋亡蛋白)的相对表达水平。

2.6 心脏功能评估

将 10% 水合氯醛麻醉后的大鼠置于自制木板上,用超声诊断仪进行大鼠心脏超声检查,并读取左心室射血分数(LVEF),用以评估大鼠心脏功能。

2.7 血清中 VEGF 含量测定

各组大鼠再灌注后取眼眶内眦动脉血 4 mL,常温静置 30 min,3 000 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 20 min,取上清液按 VEGF 试剂盒的说明书操作,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中 VEGF 含量。

2.8 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较,细胞凋亡率采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌梗死面积比例与细胞凋亡率

与假手术组比较,模型组大鼠的心肌梗死面积比例和细胞凋亡率均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠的心肌梗死面积比例和细胞凋亡率均明显降低($P < 0.05$)。与丁苯酞低剂量组比较,丁苯酞高

剂量组大鼠的心肌梗死面积比例和细胞凋亡率均明显降低($P<0.05$)。各组大鼠心肌梗死面积比例和细胞凋亡率的测定结果见表1。

表1 各组大鼠心肌梗死面积比例和细胞凋亡率的测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 1 Determination results of myocardial infarction area ratio and cell apoptosis rate of rats in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	心肌梗死面积比例, %	细胞凋亡率, %
假手术组	0	0.36±0.06
模型组	41.32±8.61**	45.31±6.33**
丁苯酞低剂量组	38.59±7.12 [#]	32.52±0.86 [#]
丁苯酞中剂量组	33.41±6.82 [#]	21.78±0.74 [#]
丁苯酞高剂量组	29.45±5.81 ^{#Δ}	10.63±0.91 ^{#Δ}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与丁苯酞低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$; vs. butylphthalide low-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.2 心肌细胞凋亡情况

在400倍光镜下可见细胞核为棕黄色的凋亡细胞、细胞核为蓝色的正常细胞。假手术组大鼠心肌细胞中绝大部分细胞核为蓝色;模型组大鼠心肌细胞中大部分细胞核为棕黄色;而丁苯酞低、中、高剂量组大鼠心肌细胞中均可观察到细胞核为棕黄色的凋亡细胞,但凋亡细胞数目明显少于模型组,其凋亡细胞数目排序为丁苯酞高剂量组<丁苯酞中剂量组<丁苯酞低剂量组。各组大鼠心肌细胞凋亡的显微镜图见图1。

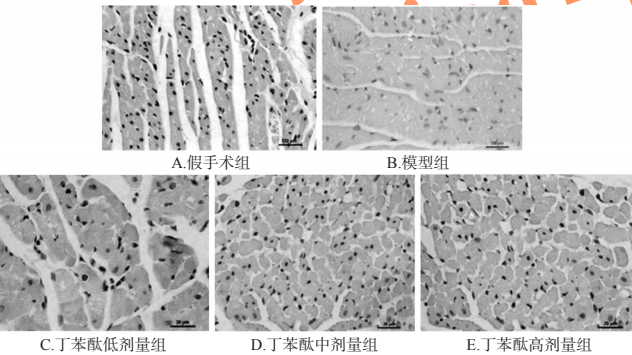


图1 各组大鼠心肌细胞凋亡的显微镜图(×400)
Fig 1 Microscope figure of myocardial cell apoptosis of rats in each group(×400)

3.3 凋亡相关蛋白的表达

与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞中Caspase-3、Fas、Caspase-9蛋白表达均明显增强,Bcl-2蛋白表达明显减弱($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠心肌细胞中Caspase-3、Fas、Caspase-9蛋白表达均明显减弱,Bcl-2蛋白表达明显增强($P<0.05$);其中,丁苯酞中、高剂量组改善效果明显强于丁苯酞低剂量组($P<0.05$)。各组大鼠心肌细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表2。

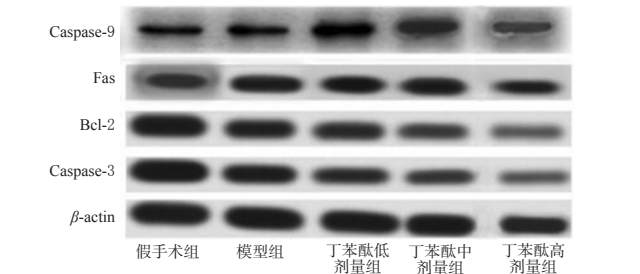


图2 各组大鼠心肌细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoresis chart of expressions of apoptosis-related proteins in myocardial cells in each group

表2 各组大鼠心肌细胞中凋亡相关蛋白表达的测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 2 Determination results of expressions of apoptosis-related proteins in myocardial cells in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	Caspase-3	Bcl-2	Fas	Caspase-9
假手术组	0.23±0.08	0.97±0.18	0.32±0.11	0.25±0.09
模型组	0.99±0.17**	0.35±0.13**	0.88±0.15**	0.89±0.15**
丁苯酞低剂量组	0.74±0.24 [#]	0.52±0.16 [#]	0.70±0.19 [#]	0.65±0.20 [#]
丁苯酞中剂量组	0.56±0.22 ^{#Δ}	0.68±0.20 ^{#Δ}	0.61±0.22 ^{#Δ}	0.57±0.23 ^{#Δ}
丁苯酞高剂量组	0.35±0.20 ^{#Δ}	0.75±0.23 ^{#Δ}	0.53±0.21 ^{#Δ}	0.42±0.17 ^{#Δ}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与丁苯酞低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$; vs. butylphthalide low-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.4 心脏LVEF及血清中VEGF含量测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠心脏LVEF和血清中VEGF含量均明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,除丁苯酞低剂量组大鼠的LVEF无明显变化外($P>0.05$),其余各给药组大鼠心脏的LVEF和血清中VEGF含量均明显升高($P<0.05$)。各组大鼠的LVEF和血清VEGF含量的测定结果见表3。

表3 各组大鼠的LVEF和血清VEGF含量的测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 3 Determination results of LVEF, serum VEGF contents of rats in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	LVEF, %	VEGF, pg/mL
假手术组	79.42±7.87	34.35±2.61
模型组	52.53±6.70**	18.01±2.94**
丁苯酞低剂量组	59.76±6.96	23.66±3.61 [#]
丁苯酞中剂量组	63.43±7.62 [#]	28.43±3.72 [#]
丁苯酞高剂量组	68.34±8.21 [#]	37.11±4.84 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

4 讨论

溶栓治疗、冠状动脉介入手术和冠状动脉搭桥等是临床治疗急性心肌梗死的常用手段,可恢复心肌细胞血

液灌注,但后来发现疗效没有达到预期值。经过多位学者的研究提出了心肌I/R的概念^[6]。心肌I/R是指心肌细胞发生缺血性损伤后,恢复血液灌注后反而更加重了原来受损细胞的功能和代谢障碍^[7]。心肌细胞凋亡是心肌I/R发生的重要标志,因此采取有效手段减少心肌I/R,抑制细胞凋亡,可达到保护心脏的目的。

关于心肌细胞凋亡的诱因有很多,主要通过两条途径实现:第一条称为外在途径,主要利用细胞间的死亡配基活化相关受体实现。Fas配体属于介导宿主防御和免疫反应的肿瘤坏死因子(TNF)超家族,通过与配体FasL结合活化,进一步与Caspase-8形成复合物,激活凋亡执行因子Caspase-3、Caspase-5、Caspase-7,最终启动凋亡程序^[8]。第二条称为内在途径或线粒体途径,Bcl-2/Bax家族相关蛋白是此途径研究最多的一系列蛋白。大量的细胞内信号包括各种应激、DNA损失和异常的细胞信号都可以引起Bcl-2家族促凋亡相关蛋白的活化,进而诱导线粒体释放细胞色素c、凋亡小体或促使Caspase-9活化,最终导致Caspase-3、Caspase-5、Caspase-7活化,通过蛋白酶水解使细胞崩溃^[9]。目前研究发现心肌I/R促细胞凋亡主要与激活Bcl-2通路有关^[10]。

丁苯酞是从芹菜籽中提取的天然产物,起初由于其显著的神经保护作用被关注。有研究结果显示,丁苯酞可抑制神经细胞凋亡、改善细胞功能、减少细胞梗死面积、改善线粒体功能和抑制氧化损伤等^[11]。而丁苯酞对心脏的作用研究较少。丁苯酞主要的作用靶点在血管内皮细胞,其作用范围广泛,可对多种器官起作用。近年对丁苯酞研究范围逐渐扩大,其对心脏的作用慢慢为人所知^[12]。Moghadam MH等^[13]最早发现了芹菜籽提取物对高血压大鼠模型的作用,并指出丁苯酞是发挥疗效的主要物质;Wang W等^[14]对上述现象的机制进一步研究,提出丁苯酞通过双孔钾离子通道TREK-1作用于心肌细胞的机制;Wang YG等^[15]应用丁苯酞作用于心肌梗死再灌注损伤大鼠,观察到丁苯酞抑制细胞凋亡的现象,但未对其机制作进一步解析。

在缺血缺氧等特定条件的刺激作用下可引发人体血管的新生。在血管新生的过程中,受到多种体内外因素包括促进与抑制VEGF、神经-内分泌-免疫系统,其中,VEGF作为一类对血管生长调节具有重要作用的细胞因子,是血管的再生及形成过程中的重要信号关联蛋白之一。本研究发现,丁苯酞可改善大鼠LVEF,提示其可改善心肌损伤大鼠心室收缩和舒张功能;还可通过上调血清VEGF的表达水平,从而对心肌缺血疾病起到一定的保护作用。

本研究发现,丁苯酞可有效预防大鼠心肌I/R,保护心功能;其机制可能是同时通过细胞凋亡外在途径及内在途径起作用,并与VEGF的表达有关。本研究结果为急性缺血性心脏病的治疗提供了新的研究思路。

参考文献

- [1] 薛凌. 丹酚酸B通过PI3K-Akt信号通路干预大鼠心肌缺血再灌注损伤的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [2] 孙经武, 王艳艳, 房灿. 藏红花酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(2): 172-175.
- [3] 孙明, 褚俊, 朱红军. 丁苯酞抑制大鼠急性心肌缺血导致的心肌损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(9): 1206-1209.
- [4] Yao LL, Huang XW, Wang YG, *et al.* Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(5): H1310-H1319.
- [5] 陈亚妮, 高俊杰, 朱文叶, 等. 速效救心丸干预心肌缺血/再灌注大鼠线粒体通透性转换孔及心肌细胞凋亡[J]. 中成药, 2015, 37(3): 469-473.
- [6] 李冬. 西洋参茎叶总皂苷通过调节线粒体功能减轻心肌缺血/再灌注损伤的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [7] 王艳艳, 孙经武, 樊维娜, 等. 藏红花酸预处理对心肌缺血大鼠凋亡相关蛋白Bcl-2与Bax表达的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(1): 93-96.
- [8] 杨小霞, 李国前, 王杰华, 等. 丁苯酞对大鼠急性脑缺血再灌注后Fas与FasL表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(7): 588-590.
- [9] 程宇凌, 任艳萍. Caspase-3和核因子- κ B在细胞凋亡外途径中的双向作用研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(18): 2837-2840.
- [10] 王健, 姚天明, 韩雅玲, 等. 冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(10): 2064-2066.
- [11] 王蕊, 步燕利, 刘超. 丁苯酞对缺氧诱导神经细胞凋亡的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20): 2382-2385.
- [12] 李俊, 黄从新. 丁苯酞对大鼠心肌梗死周边区交感神经重构的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2015, 34(3): 308-311.
- [13] Moghadam MH, Imenshahidi M, Mohajeri SA. Antihypertensive effect of celery seed on rat blood pressure in chronic administration[J]. *J Med Food*, 2013, 16(6): 558-563.
- [14] Wang W, Zhang M, Li P, *et al.* An increased TREK-1-like potassium current in ventricular myocytes during rat cardiac hypertrophy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61(4): 302-310.
- [15] Wang YG, Li Y, Wang CY, *et al.* L-3-n-Butylphthalide protects rats' cardiomyocytes from ischaemia/reperfusion-induced apoptosis by affecting the mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Acta Physiol Oxf*, 2014, 210(3): 524-533.

(收稿日期: 2017-01-19 修回日期: 2017-06-07)

(编辑: 邹丽娟)